MicroRNA-196a-5p对3T3-L1前脂肪细胞增殖和分化的影响效应[1]

杨琼[1,*]，王灵慧[2,*]，辜浩[2]，刘进远[3]，堵晶晶[2]，张顺华[2]，朱砺[2]

（1. 成都农业科技职业学院，成都，611130；2. 四川农业大学动物科技学院，成都，611130；3. 四川省畜牧科学研究院，成都，610066）

摘要 目的：探究miR-196a-5p对小鼠前体脂肪细胞增殖、分化的影响及其潜在的分子机制。方法：①构建小鼠肥胖模型，RT-PCR检测脂肪组织中miR-196a-5p表达量；②鸡尾酒法诱导3T3-L1前脂肪细胞分化，RT-PCR检测分化过程中miR-196a-5p的表达变化；③合成miR-196a-5p mimics和inhibitors转染3T3-L1细胞，以CCK8、EdU试剂盒检测miR-196a-5p对3T3-L1前脂肪细胞增殖的影响作用；④运用油红O染色、甘油三酯测定评估miR-196a-5p对3T3-L1细胞分化的影响；⑤RT-PCR检测miR-196a-5p对前脂肪细胞增殖、分化相关基因的影响；⑥ 结合前人文献，运用生物信息软件、荧光素酶报告系统对miR-196a-5p调控脂肪细胞分化的靶基因进行筛选和验证。结果：①miR-196a-5p在肥胖小鼠脂肪组织中高表达，在3T3-L1前脂肪细胞分化过程中先升高后下降；②与阴性对照组相比，mimics转染抑制了3T3-L1细胞增殖，inhibitors转染促进了3T3-L1细胞增殖；③ 与阴性对照组相比，mimics组积累了大量油红着色的脂滴，甘油三酯含量增多；而inhibitors组的脂滴少而小，甘油三酯含量相对降低；④与阴性对照组相比，mimics转染抑制了增殖标志基因*Cyclin D1*、*Cyclin E*、*CDK2*和*CDK4*表达，促进了分化标志基因*PPARγ*、*C/EBPα*、*LPL*、*aP2*等的表达；inhibitors转染则表现出与mimics转染相反的作用；⑤miR-196a-5p可显著抑制野生型*MAP4K3*和*MAPK1* 3'UTR荧光素酶活性，而突变绑定位点可废除该抑制效应。结论：miR-196a-5p不仅可抑制3T3-L1前脂肪细胞增殖，还可促进其诱导分化、沉积脂滴；miR-196a-5p可能通过靶向调节*MAP4K3*和*MAPK1*来介导3T3-L1前脂肪细胞分化。

关键词：miR-196a-5p；增殖；分化；MAP4K3；MAPK1

The effect of miR-196a-5p on proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocyte

[1] 基金项目：四川省科技支撑计划项目（2016NZ0089；16ZC2838；2018KZ0057）

作者简介：杨琼，副教授，主要从事畜禽健康养殖研究。E-mail: 906066681@qq.com

*：共享第一作者

通讯作者：朱砺，教授，博士生导师，研究方向：猪的遗传育种。E-mail: zhuli7508@163.com

Qiong Yang [1,*], Linghui Wang[2,*], Hao Gu[2], JingJing Du[2], Jinyuan Liu [3], Shunhua Zhang[2], Li Zhu[2]

Chengdu Agricultural College, Chengdu,611130;2.College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130;3.Sichuan Animal Science Academy, Chengdu 610066,China；）

Abstract

Objective: To investigate the effect of miR-196a-5p on proliferation and differentiation of mouse adipocyte, and explore its potential molecular mechanisms. **Methods:** ① Utilizing RT-PCR, miR-196a-5p expression levels in adipose tissues from obese or normal mice were measured; ②, The miR-196a-5p expression level during preadipocyte differentiation were measured by RT-PCR method, after 3T3-L1 cells were induced to differentiate by cocktail method; ③ After miR-196a-5p mimics or inhibitors were transfected into 3T3-L1 cells, CCK8 and EdU detection were performed to evaluate the effect of miR-196a-5p on its proliferation; ④measuring the effect of miR-196a-5p on 3T3-L1 cells differentiation by Oil red O staining and triglyceride assay; ⑤ detecting the effect of miR-196a-5p on the expression levels of 3T3-L1 cells proliferation and differentiation related genes; ⑥ based on previous reports, using bioinformatics and luciferase reporter assays to identify targets that miR-196a-5p regulates preadipocyte differentiation. **Result**: ①miR-196a-5p not only were highly expressed in adipose tissues of obese mice, but also were expressed dynamically during 3T3-L1 cells differentiation; ② when compared with negative control, mimics transfection inhibited 3T3-L1 cells proliferation, inhibitors transfection promoted its proliferation； ③ when compared with negative control, mimics or inhibitors transfection increased or decreased lipid accumulation and triglyceride content, respectively; ④ when compared with negative control, mimics transfection repressed proliferation related markers (*Cyclin D1*、*Cyclin E*、*CDK2* and *CDK4*) and promoted differentiation related markers (*PPARγ*、*C/EBPα*、*LPL* and *aP2*), however, inhibitors transfection had an opposite effect than that of mimics transfection; ⑤ the miR-196a-5p mimics significantly suppressed a luciferase reporter gene whose expression was regulated by the mouse *MAP4K3* and *MAPK1* mRNA 3′-UTR, whereas mutation of the miR-196a-5p binding site in murine *MAP4K3* and *MAPK1* 3′-UTR completely abolished this response. **Conclusions**: miR-196a-5p might inhibit 3T3-L1 preadipocyte proliferation, and enhance its differentiation. The regulation of preadipocyte

differentiation may be mediated by targeting *MAP4K3* and *MAPK1*.

Key worlds: miR-196a-5p；proliferation；differentiation；MAP4K3；MAPK1

引言

当前，肥胖已成为全球性健康问题。大量研究表明，肥胖或超重直接威胁人类健康，其可显著增加诸如 II 型糖尿病、胰岛素抵抗、心血管疾病、慢性炎症、脂肪肝等疾病的患病几率[1-3]。日常能量摄入过多或机体代谢障碍造成的脂肪组织过度积累被认为是肥胖或超重形成的主要原因[4]，深入研究脂肪形成和脂质代谢的分子机制有助于人类预防和治疗肥胖相关疾病。

MicroRNAs（miRNAs）是一类长度约为 18-24nt 的单链非编码小 RNA 分子，可通过种子序列与其靶 mRNAs 的 3'-非编码区（3'UTR）特异性结合，在转录后水平调控靶基因，从而介导细胞增殖、凋亡、分化等复杂的生物学过程[5-7]。近年来，通过高通量测序技术鉴定了大量与脂肪发育相关的 miRNAs[8-10]。功能分析发现，miRNAs 在脂肪形成及脂质代谢过程中扮演重要角色。如 Karbiener 等[11]发现 miR-27b 通过直接靶向 *PPARγ*抑制脂肪细胞分化；Peng 等[12]报道 miR-224 不仅可负向调节脂肪细胞早期分化过程且可参与脂肪酸代谢调控；Lv 等[13]证明 miR-129-5p 可通过负向调节 *G3BP1* 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖。已有的证据表明 miR-196a-5p 广泛参与生物学过程调控，如介导膀胱癌细胞凋亡、促进胶质瘤恶化及调节胚胎干细胞自我更新[14-16]。然而，未有研究报道 miR-196a-5p 是否介导脂肪形成。小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞是研究脂肪发育的经典细胞模型。本文以 3T3-L1 细胞为研究载体，旨在探究 miR-196a-5p 在脂肪细胞增殖、分化过程中的作用，并初步探究其分子机制。

1 材料与方法

1.1 脂肪组织采集

12 只从达硕生物科技公司（成都，中国）购买的同批次 6 周龄雄性昆明鼠被分作两组，在相同饲养条件下，分别饲喂高脂日粮（HFD）和正常日粮（NCW）。16 周后，脱颈处死小鼠，并迅速采集性腺脂肪、腹股沟脂肪及肾周脂肪置于液氮。随后，样品被转移至-80℃保存。本试验的所有动物实验都经过了四川农业

大学动物科技学院实验动物护理和使用委员会的批准。

1.2 细胞培养

置于含 10%胎牛血清（FBS，Gibco, 美国）的 DMEM 高糖培养基（Gibco）中小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞（中科院干细胞库，上海，中国）在 37℃、5%CO_2 的细胞培养箱中培养。当培养瓶中的细胞密度达 80%时，细胞被胰酶消化并接种于 12 孔板；当 12 孔板细胞密度达 70-80%时，将增殖培养液（DMEM+10% FBS）替换为诱导液（DMEM+10%FBS+1.7μmol/L 胰岛素+1μmol/L 地塞米松+0.5μmol/L IBMX）；3 天后，将诱导液替换为维持液（DMEM+10%FBS+1.7μmol/L 胰岛素）；3 天后，维持液被替换为增殖培养液，直至实验结束。胰岛素地塞米松及 IBMX 均购自 Sigma 公司（上海，中国）。

1.3 细胞转染

根据试剂操作说明，用 Lipofactamine 2000（Invitrogen, 美国），对置于 96 空板或 12 空板、密度达到实验要求（增殖实验为 30-40%，分化实验为 70-80%）的 3T3-L1 细胞分别转染由广州锐博生物公司设计和合成的 miR-196a-5p mimics（浓度 50 nM, 产品编号 miR20000518-1-5 ；5′-UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG-3′）、inhibitors（浓度 100 nM，产品编号 miR20000518-1-5；5′- CCCAACAACAUGAAACUACCUA-3′）、negative control（NC，浓度 50 nM，产品编号 miR01201-1-5 和 miR02201-1-5；5′-UUUGUACUACACAAAAGUACUG-3′，5′-CAGUACUUUUGUGUAGUACAAA-3′）。转染 12 小时后，更换新细胞培养基。为了确保 miR-196a-5p mimics 和 inhibitors 的转染效果，转染每 2 天执行一次。

1.4 CCK8 与 EdU 检测

根据操作说明书，置于增殖培养液中、密度达 30-40%、接种于 96 孔板的 3T3-L1 细胞被分别转染 miR-196a-5p mimics（50 nM）、inhibitors（100 nM）和 negative control（50 nM）。随后，根据 CCK8 增殖检测试剂盒（碧云天，上海，中国）操作说明，分别检测转染后 0、12、24、48、72 小时（h）的 3T3-L1 细胞

增殖情况。具体操作为：每孔被处理的细胞中加入 10μL CCK8 溶液，细胞培养箱中继续孵育 1.5 小时后，利用酶标仪在 450nm 波长处测定其吸光值。对于 EdU 增殖分析，每孔被转染 24 小时的 3T3-L1 细胞继续以 10 μM EdU 溶液孵育 10 小时，随后根据 EdU 试剂盒（产品编号 C10310-3）操作说明检测 EdU 标记的新生成细胞。上述实验中，每个处理组的每个时间点均设置 6 个重复，最终的 EdU 相关图片由 Olympus IX53 荧光显微镜(Olympus; Tokyo, Japan)获取。

1.5 油红 O 染色

油红 O 染色操作步骤：1）先用 PBS 清洗分别转染 miR-196a-5p mimics、inhibitors、negative control 且诱导分化 8 天的 3T3-L1 细胞，随后于室温下用 4%多聚甲醛固定 30 分钟；2）去掉多聚甲醛，PBS 清洗 3 遍，每遍 5 分钟，之后用油红 O 工作液于室温下孵育细胞；3）1 小时后，PBS 清洗 3 遍，每遍 5 分钟，最后每孔加入 300μL PBS 将油红着色后的细胞覆盖，于显微镜下观察、拍照。4）为了间接测定甘油三酯含量，拍照结束后的每孔细胞加入 200μL 异丙醇萃取与脂滴结合的油红 O，随后用酶标仪于 510nm 波长处测定其吸光值。

1.6 实时荧光定量 PCR

用 Trizol 法提取根据实验设计处理结束后的细胞或组织样中的总 RNA（其中，细胞样本先用 PBS 清洗 3 次）；取 1μg RNA 使用 Mir-XTM miRNA First-Strand Synthesis 试剂盒（TaKaRa，大连，货号 1604342A）、PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraer 试剂盒（TaKaRa，货号 AK4002）分别反转获取 miRNA、mRNA 对应的 cDNA，并被稀释为 50 ng/μL。随后，根据 SYBR Permix Ex Taq Kit，运用 CFX96 荧光定量仪（Bio-Rad，美国）检测 miR-196a-5p 及相关基因。最后，以*β-actin*、*U6* 分别作为 miRNA、mRNA 内参，运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算其相对表达量。所用引物序列见表 1.

表 1. RT-PCR 引物序列

Table 1. The primer sequences used for qRT:PCR

Gene	Primer sequence (5`→3`)	TM/℃
PPARγ	F:CTCCAAGAATACCAAAGTGCGA	58.3

	R:GCCTGATGCTTTATCCCCACA	
Cyclin D1	F: GTTGCTGGAATTTTCGGGGT	60.0
	R: AGCGTCCCTGTCTTCTTTCA	
C/EBPα	F:CAAGAACAGCAACGAGTACCG	58.3
	R:GTCACTGGTCAACTCCAGCAC	
ELOVL6	F:AAGCACGCTCTATCTCCTGTT	60.0
	R:CTGCGTTGTATGATCCCATGAA	
Cyclin E	F: AGCCTCGGAAAATCAGACCA	58.3
	R: TCCTGTGCCAAGTAGAACGT	
FAS	F:TATCAAGGAGGCCCATTTTGC	60.0
	R:TGTTTCCACTTCTAAACCATGCT	
aP2	F: CGATCCCAATGAGCAAGTGG	63.5
	R: TGGGTCAAGCAACTCTGGAT	
SREBP-1c	F: GCAGCCACCATCTAGCCTG	57.5
	R: CAGCAGTGAGTCTGCCTTGAT	
SCD	F: TTCTTGCGATACACTCTGGTGC	54.3
	R: CGGGATTGAATGTTCTTGTCGT	
LPL	F:TGGCGTAGCAGGAAGTCTGA	60.0
	R:TGCCTCCATTGGGATAAATGTC	
CDK2	F: CCCTTCCCAAAGCCCTTTTC	63.5
	R: GAAGAGGGGAAGAAGCTGGT	
MAP4K3	F: AGAAATCCTTACACGGGCCA	58.2
	R: CCAGCATCTCAAACATCCGG	
CDK4	F: GTCAGTTTCTAAGCGGCCTG	61.0
	R: CACGGGTGTTGCGTATGTAG	
MAPK1	F: GAGGGGTTGGTGTGAGATCA	57.0
	R: CCCATCCACCAGACAGCTTA	
miR-196a-5p	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	61.0
U6	F:CTCGCTTCGGCAGCACA	61.0

	R:AACGCTTCACGAATTTGCGT	
β-actin	F:TGGAATCCTGTGGCATC CATGAAAC	60.0
	R:TAAAACGCAGCTCAG TAACAGTCCG	

注：F 代表上游引物序列；R 代表下游引物序列；TM 代表退火温度； U6、*β-actin* 分别做 miRNA、mRNA 的内参基因。

1.7 荧光素酶报告基因实验

野生型（WT-*MAPK1*，WT-*MAP4K3*）或突变型（Mut-*MAPK1*，Mut-*MAP4K3*）*MAPK1* 和 *MAP4K3* 的 3'UTRs 均由成都擎科生物设计和构建。利用 Lipofactamine 3000，miR-196a-5p mimics 或 negative control 与 1）WT-*MAPK1* 或 Mut-*MAPK1*；2）分别将 WT-*MAP4K3* 或 Mut-*MAP4K3* 共转染入密度为 80％的 3T3-L1 细胞。24 小时后，根据 Dual-Luciferase Reporter Assay System 试剂盒（Promega，美国）操作说明，对细胞荧光素酶活性进行检测。其中，相对荧光苏酶活性=萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶；每个处理设置 5 个重复。

1.8 数据统计

实验数据采用 SPSS 22.0 软件进行 Student's t-test 分析，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义；所有结果均用平均值±标准差（Mean ± SD）表示。

2 结果与分析

2.1 miR-196a-5p 在肥胖小鼠脂肪组织中高表达

检测 miR-196a-5p 在肥胖或正常小鼠不同脂肪组织中的表达量差异情况，RT-PCR 结果显示，与正常小鼠相比，miR-196a-5p 的表达水平在肥胖小鼠性腺脂肪、腹部皮下脂肪及肾周脂肪中均显著高表达。其中，miR-196a-5p 在肥胖小鼠和正常小鼠腹股沟脂肪组织中的表达差异最大，达 7 倍[图 1]。这部分结果暗示 miR-196a-5p 可能与脂质生成相关。

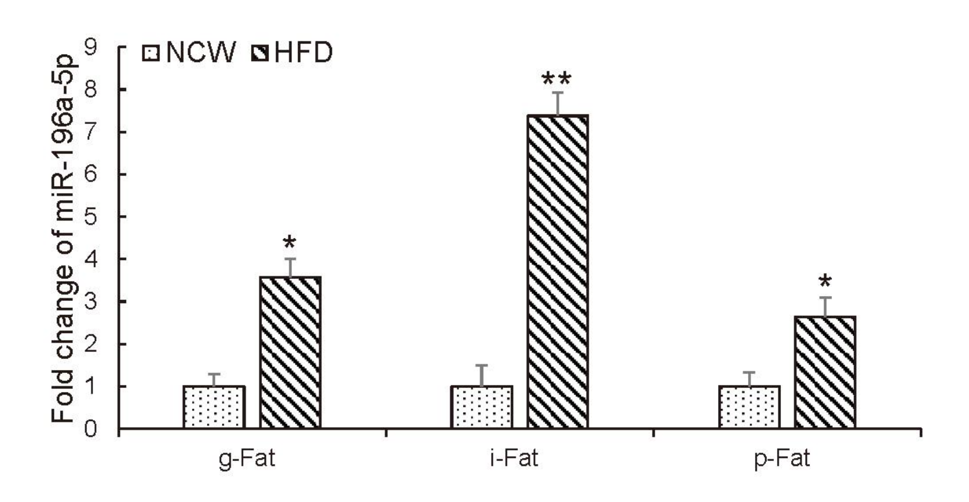


图 1 miR-196a-5p 在肥胖小鼠脂肪组织中高表达

Fig. 1 miR-196a-5p highly expressed in adipose tissues of obese mice

RT-PCR measured the expression of miR-196a-5p in adipose tissues including gonadal fat (g-Fat), inguinal fat (i-Fat) and perirenal fat (p-Fat) from HFD- and NCW-fed mice. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

2.2 miR-196a-5p 在 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中的表达变化

用鸡尾酒法诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化，随后分别检测分化第 0、2、4、6、8 天 miR-196a-5p 的表达变化。结果显示，从分化第 0 天到分化第 4 天，miR-196a-5p 的表达量呈逐渐上调趋势，并在第 4 天达到峰值。其中，与 0 天相比，miR-196a-5p 的表达在第 2 天上调 1.9 倍，在第 4 天上调 10.3 倍。分化第 4 天后，miR-196a-5p 的表达水平迅速下降，并最终在第 8 天维持与第 0 天相似表达水平[图 2]。

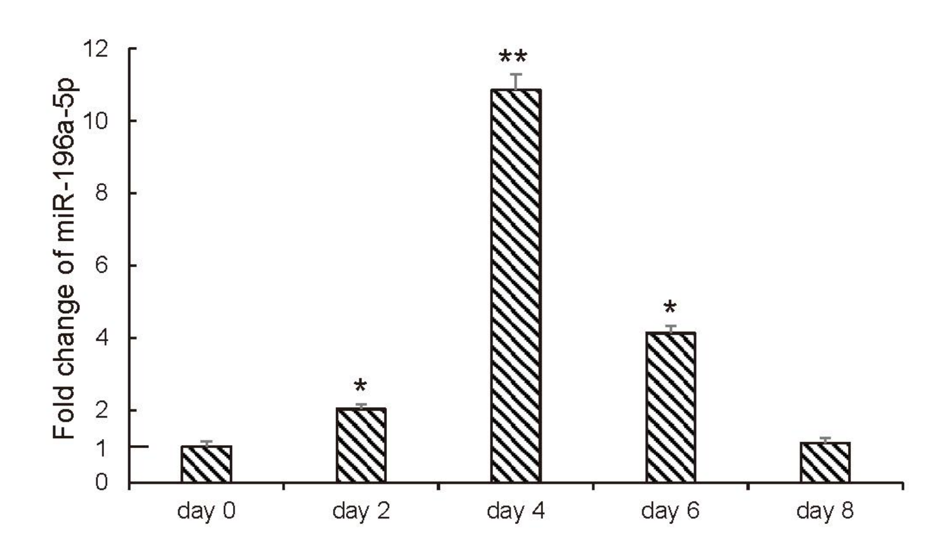


图 2 miR-196a-5p 在 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中的表达

Fig. 2 The expression of miR-196a-5p during 3T3-L1 preadipocyte differentiation.

RT-PCR measured the expression levels of miR-196a-5p at day 0, 2, 4, 6, 8 of preadipocyte differentiation. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

2.3 miR-196a-5p 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖

用脂质体 lip2000 分别将 miR-196a-5p mimics、inhibitors、negative control 转染入增殖期的 3T3-L1 细胞。48 小时后，检测各组中 miR-196a-5p 的表达量。结果显示，与对阴性对照组相比，mimics 组的 miR-196a-5p 表达量增加了 5.3 倍，inhibitors 组的 miR-196a-5p 表达量减少了 62.4％，表明 miR-196a-5p mimics 和 inhibitors 分别增加或抑制了 3T3-L1 细胞内 miR-196a-5p 的表达量[图 3(a)]。随后运用 CCK8、EdU 试剂盒检测 miR-196a-6p 对 3T3-L1 细胞增殖的影响。CCK8 检测显示：与阴性对照组相比，过表达 miR-196a-5p 在处理后第 24h、72h 显著减少了 3T3-L1 细胞增殖，在处理后第 48h 极显著地减少了其增殖；相反，抑制 miR-196a-5p 在处理后第 24h 显著促进了 3T3-L1 细胞增殖，在处理后 48h、72h 极显著地促进了其增殖[图 3(b)]。EdU 检测显示：与阴性对照组相比，过表达 miR-196a-5p 可显著降低 EdU 阳性细胞比率，抑制 miR-196a-5p 可显著增加 EdU 阳性细胞比率，表明过表达或抑制 miR-196a-5p 可分别减少或增加新生成的 3T3-L1 细胞数目[图 3(c-d)]。为进一步确认上述结果，又检测了细胞增殖标志基

因的表达变化。结果显示，与阴性对照组相比，过表达 miR-196a-5p 显著抑制了 *Cyclin D1*、*Cyclin E*、*CDK2* 和 *CDK4* 的表达水平；相反，抑制 miR-196a-5p 显著增加了其表达水平[图 3(e)]。上述结果表明：miR-196a-5p 可抑制 3T3-L1 细胞增殖。

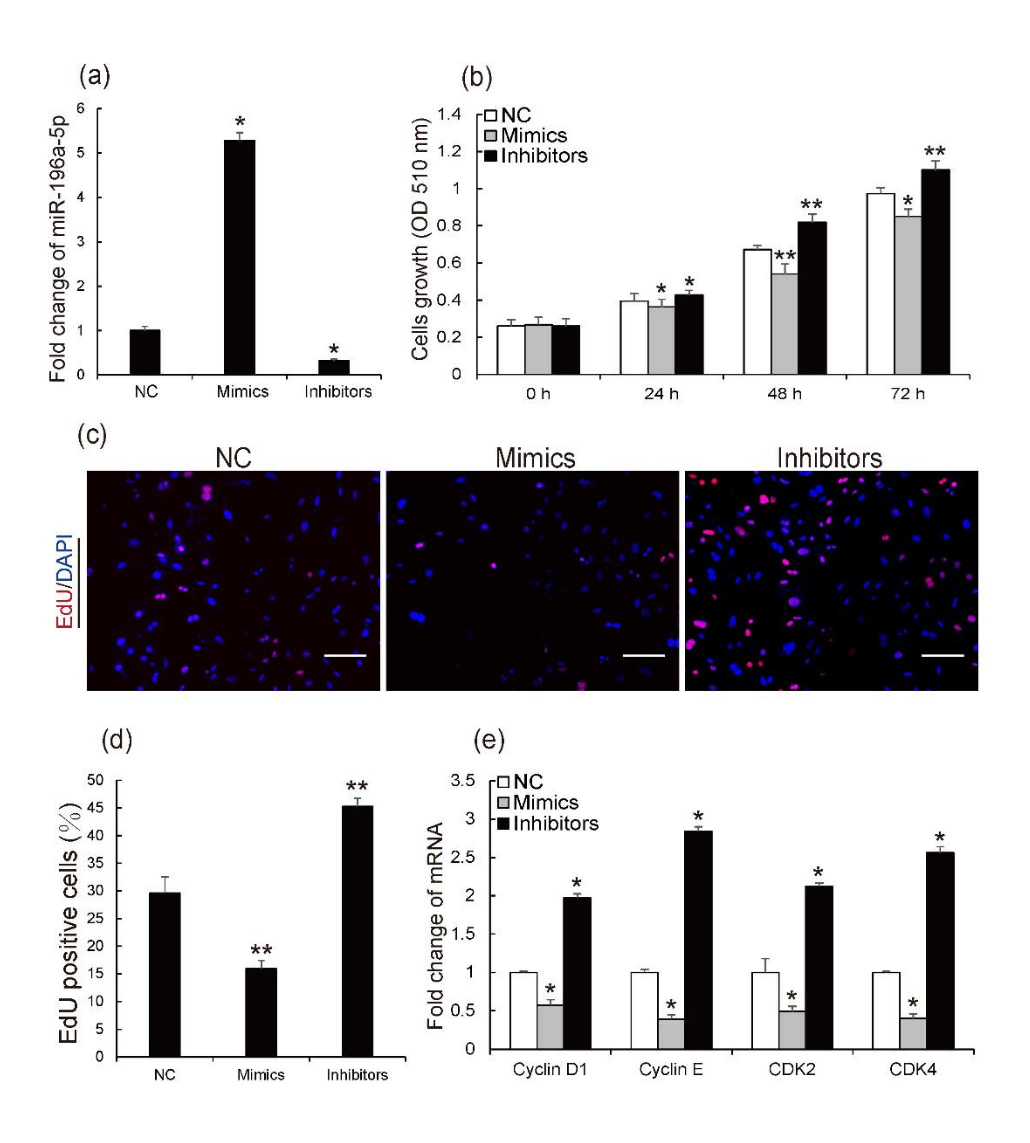


图 3 miR-196a-5p 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖

Fig. 3 miR-196a-5p inhibited 3T3-L1 preadipoyte proliferation

3T3-L1 cells were transfected with miR-196a-5p mimics, inhibitors, or negative control (NC). (a) Expression levels of miR-196a-5p measured by RT-PCR. Effects of the miR-196a-5p mimics, inhibitors and control on 3T3-L1 cells proliferation were determined by (b) CCK-8 and (c-d) Edu assays. RT-PCR measured the expression levels of Cyclin D1, Cyclin E, CDK2 and CDK4. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

2.4 miR-196a-5p 促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化

再进一步研究 miR-196a-5p 对 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化为成熟脂肪细胞的影响。miR-196a-5p mimics、inhibitors 转染效率如图 4(a)所示。结果表明：与阴性对照组相比，mimics、inhibitors 转染可分别增加或抑制处于分化期 3T3-L1 细胞的 miR-196a-5p 表达。对转染、诱导分化第 8 天的细胞进行油红 O 染色发现：与阴性对照组相比，mimics 组细胞分化迹象明显，脂滴多而大；相反，inhibitors 组细胞分化被减弱，脂滴少而小[图 4(b)]。甘油三酯含量检测也呈现相似结果，与阴性对照组相比，mimics 组甘油三酯含量显著增多，inhibitors 组甘油三脂含量极显著减少[图 2(c)]。为了进一步验证上述结果，再检测了脂肪特异性基因 *PPARγ*、*C/EBPα*、*LPL*、*aP2*、*SCD*、*ELOVL6*、*SREBP1*、*FAS* 的表达水平。结果显示：与对照组相比， mimics 组的 PPARγ、C/EBPα、LPL、aP2、SCD、ELOVL6、*SREBP1*、*FAS* 表达量分别增加 4.6 倍、4.2 倍、2.1 倍、3.6 倍、2.4 倍、2.8 倍、2.45 倍、2.89 倍；inhibitors 组相应基因的表达量分别减少了 71.6%、64.8%、35.2%、46.5%、40.3%、33.7%、39.1%、46.8%，表明过表达 miR-196a-5p 可促进脂肪特异性基因的表达，抑制则可降低脂肪特异性基因的表达[图 2(d)]。

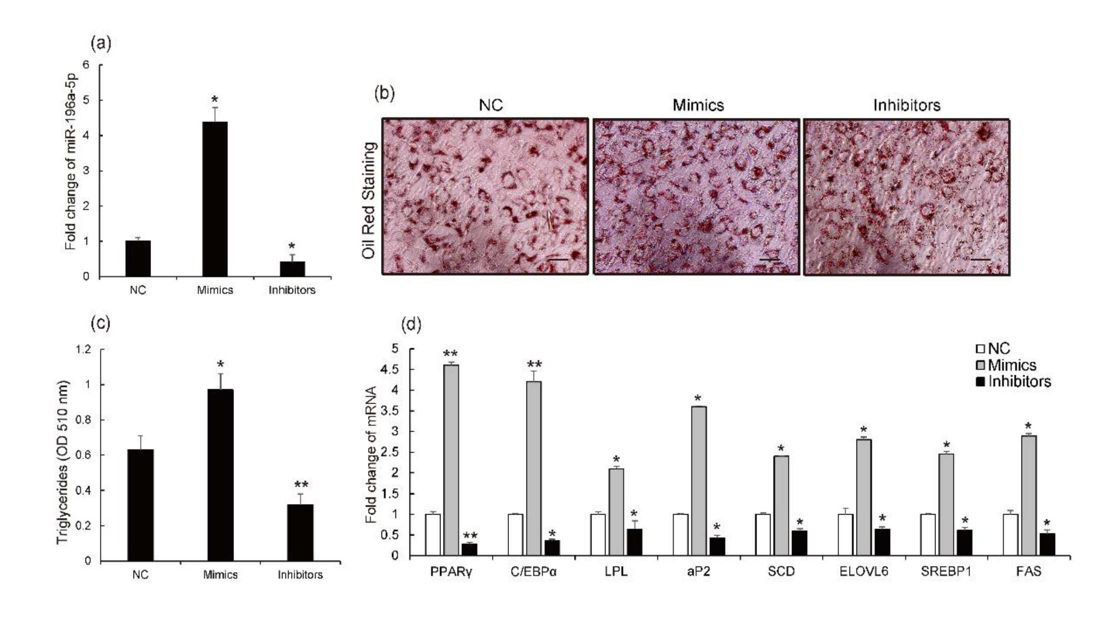


图 4 miR-196a-5p 促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化

Fig. 4 miR-196a-5p promoted 3T3-L1 preadipocyte differentiation

(a) qRT-PCR measured the expression levels of miR-196a-5p after transfection with the mimics, inhibitors or negative control (NC). (b) Transfected and differentiated cells stained with oil red O. (c) Triglyceride content measured by spectrophotometric analysis. (d) RT-PCR determined the expression levels of markers related adipocyte differentiation. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

2.5 miR-196a-5p 调控 3T3-L1 前脂肪细胞分化的靶基因鉴定

用 TargetScan 7.1 在线软件预测 miR-196a-5p 的潜在靶基因，发现 *MAP4K3* 3'UTR 的第 1026-1032 位碱基[图 5(a)]、*MAPK1* 3'UTR 的第 435-442 位碱基[图 5(b)]与 miR-196a-5p 的种子序列（成熟体序列 2-8 位）完全互补配对。此外，qRT-PCR 分析发现，在分化期 3T3-L1 细胞中过表达 miR-196a-5p 可显著抑制 *MAP4K3* 和 *MAPK1* 的表达；相反，抑制 miR-196a-5p 的表达可显著促进 *MAP4K3* 和 *MAPK1* 的表达[图 5(c-d)]。之前，Huang 等[17]和黄等[18]已经证明 *MAPK1* 可抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化。这些结果暗示 *MAP4K3* 和 *MAPK1* 是 miR-196a-5p 调控 3T3-L1 前脂肪细胞分化的潜在靶基因。为了验证 miR-196a-5p 与 *MAP4K3*、*MAPK1* 的直接靶标关系，进一步执行了双荧光报告系统实验。如图 5(e-f)所示，荧光素酶活性检测结果显示：miR-196a-5p 可显著抑制 *MAP4K3* 和 *MAPK1* 的 3'UTR 荧光素酶活性，而当结合位点被突变后，其抑制作用消失。

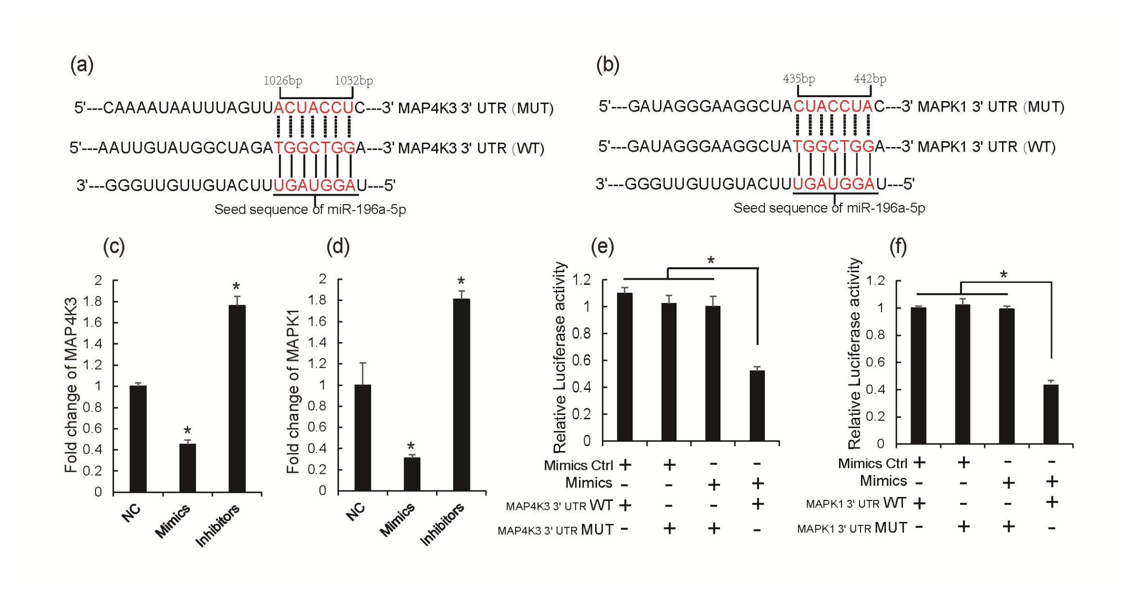


图 5 *MAP4K3* 和 *MAPK1* 是 miR-196a-5p 的靶基因

Fig. 5 *MAP4K3* and *MAPK1* were target genes of miR-196a-5p

Sequence alignment of miR-204-5p with the 3′ UTR of mouse (mmu) *MAP4K3* (a) and *MAPK1* (b) mRNA. The binding site and seed region of miR-196a-5p are indicated in red. Expression levels of *MAP4K3* (c) and *MAPK1* (d) in transfected and differentiated cells were measured by RT-PCR. (e-f) A recombinant double fluorescent reporter plasmid containing the luciferase gene under the control of either the wild-type (WT) 3′ UTR of *MAP4K3* and *MAPK1*, or a mutant sequence (MUT) were used to investigate the interaction of miR-196a-5p with the 3′ UTR of *MAP4K3* and *MAPK1* mRNA. This assay revealed the repressive effect of miR-196a-5p on *MAP4K3* and *MAPK1* activity. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3 讨论

已经证明 miRNAs 可在转录后水平广泛地调节基因表达，从而介导复杂有序的生物学过程，如胚胎干细胞的自我更新、肿瘤的发生与抑制、细胞增殖、细胞分化及细胞凋亡等[19-21]。随着高通量测序技术的快速发展，鉴定了大量在脂肪发育过程中差异表达的 miRNAs。功能分析表明，这些差异表达的 miRNAs 在脂肪发育过程中扮演重要角色。如 miR-155 敲除小鼠可以上调棕色脂肪标志基因，抵抗高脂饲料诱导的白色脂肪沉积[22]；miR-145 可促进小鼠前脂肪细胞增殖，并抑制其分化未成熟的脂肪细胞[23]；miR-199a-3p 可通过负向调节 *SCD* 的表达水平而调控脂肪细胞分化及脂肪酸组成[24]。本研究中，通过构建肥胖小鼠模型来检测 miR-196a-5p 在脂肪快速沉积过程中的表达变化。如图 1 所示，与饲喂正常日粮的小鼠相比，miR-196a-5p 在高脂日粮诱导的肥胖小鼠脂肪组织中显著高表达。小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞是研究脂肪发育的经典细胞模型。大量研究结果表明，那些在 3T3-L1 细胞分化过程中动态表达的 miRNAs 往往参与了脂肪细胞增殖、分化的调控[23, 25]。为此，检测了 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化后 miR-196a-5p 的表达变化。结果显示，miR-196a-5p 的表达量在分化过程中先上调后逐渐下降，暗示 miR-196a-5p 在脂肪细胞增殖、分化过程中也扮演着重要角色。过表达实验或抑制实验证明：miR-196a-5p 可抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖，促进其分化及脂滴累积。脂肪细胞的增殖和分化受到许多因子的调控，如 Cyclin D1 和 Cyclin E 在细胞从 G1 期进入 S 期过程中扮演着关键作用，它们主要通过调控细胞周期依赖素 CDK2、CDK4 推动细胞周期由 G1 期进入到 S 时期，进而促进细胞增殖[26-29]。而 *PPARγ*和 *C/EBPα*是调控脂肪细胞分化的关键转录因子，它们可通过靶向调节脂肪酸合成、转运相关因子，如 *LPL*、*SCD*、*ELOVL6*、*SREBP1*、*FAS* 等，促进脂肪细胞分化、沉积脂肪[30-33]。符合 miR-196a-5p 功能研究结果，本研究 RT-PCR 检测发现，miR-196a-5p 可抑制细胞增殖调节因子 *Cyclin D1*、*Cyclin E*、*CDK2* 和 *CDK4*；相反，促进了 *PPARγ*、*C/EBPα*、*LPL*、*SCD*、*ELOVL6*、*SREBP1* 等脂肪细胞分化标志基因的表达。这些结果表明，miR-196a-5p 可通过直接或间接调节脂肪细胞增殖、分化关键调节因子来调控脂肪细胞的增殖与分化。

之前的研究表明，miRNAs 可通过其种子序列与靶基因 3'UTR 的特异性位点进行互补配来抑制其转录，从而调控复杂的生物学过程[34]。为了深入探究

miR-196a-5p 调节脂肪细胞分化的分子机制，进一步用生物信息软件 TargetScan 预测了 miR-196a-5p 的潜在靶基因。如图 5 所示，*MAPK1* 和 *MAP4K3* 的 3'UTR 含有 miR-196a-5p 种子序列的反向互补序列，在 3T3-L1 细胞过表达或抑制 miR-196a-5p 可显著降低或促进 *MAPK1* 和 *MAP4K3* 的 mRNA 水平，表明 miR-196a-5p 可负向调控 *MAPK1* 和 *MAP4K3* 的表达。随后，双荧光实验证明 *MAPK1* 和 *MAP4K3* 是 miR-196a-5p 的直接靶基因。MAPK 家族在前脂肪细胞分化过程中扮演着重要角色[35, 36]。最近，黄等[17]发现抑制 3T3-L1 前脂肪细胞内 *MAPK1* 的表达可显著促进其分化为成熟脂肪细胞，miR-378a-3p 也可通过直接靶向抑制 *MAPK1* 来促进脂质生成，通过 shRNA 干扰 3T3-L1 细胞内 *MAP4K3* 表达可显著降低 3T3-L1 前脂肪细胞分化为脂肪细胞的比例。结合之前的双荧光报告基因和 RT-PCR 实验结果，本研究证明 miR-196a-5p 可通过靶向 *MAPK1* 和 *MAP4K3* 促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞。

参考文献

[1] Sun B, Karin M. Obesity, Inflammation and Liver Cancer. Journal of Hepatology, 2012, 56(3): 704-713.

[2] Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM, et al. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature, 2007, 444(7121): 840-846.

[3] Sarma S, Devlin RA, Gilliland J, et al. The Effect of Leisure-time Physical Activity on Obesity, Diabetes, High BP and Heart Disease among Canadians: Evidence from 2000/01 to 2005/06. Working Papers. 2013, 01:1-62

[4] Mayer J, Thomas DW. Regulation of food intake and obesity. Science, 1967, 156(3773): 328-337.

[5] Li J. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. Cell, 2009, 136 (2) :215-233

[6] Ambros V. The function of animal MicroRNAs. Nature, 2004, 431(7006): 350-355.

[7] Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. Development, 2005, 132(21): 4645-4652.

[8] Perri R, Nares S, Zhang S, et al. MicroRNA modulation in obesity and periodontitis. Journal of Dental Research, 2012, 91(1): 33-38.

[9] Kajimoto K, Naraba H, Iwai N. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. Rna-a Publication of the Rna Society, 2006, 12(9): 1626-1632.

[10] Berthold S, Kovacs P, Fasshauer M, et al. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. Plos One, 2009, 4(3): e4699.

[11] Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, et al. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARγ. Biochemical and Biophysical Research Communications , 2009, 390(2): 247-251.

[12] Peng Y, Xiang H, Chen C, et al. MiR-224 impairs adipocyte early differentiation and regulates fatty acid metabolism. International journal of biochemistry & cell biology, 2013, 45(8): 1585-1593.

[13] Lv S, Ma M, Sun Y et al. MicroRNA-129-5p inhibits 3T3-L1 preadipocyte proliferation by targeting G3BP. Animal Cells & Systems the Official Publication of the Zoological Society of Korea, 2017, 21(4): 269-277.

[14] Pan J, Li X, Wu W, et al. Long non-coding RNA UCA1 promotes cisplatin/gemcitabine resistance through CREB modulating miR-196a-5p in bladder cancer cells. Cancer Letters, 2016, 382(1): 64-76.

[15] Zhao X, Liu Y, Zheng J, et al. GAS5 suppresses malignancy of human glioma stem cells via a miR-196a-5p/FOXO1 feedback loop. Biochimica Et Biophysica Acta. 2017, 1864 (10): 1605-1617.

[16] 赵华路, 姚南, 魏雪菊,等. miR-196a-5p 抑制小鼠胚胎干细胞的自我更新. 基础医学临床, 2014, 34(12): 1645-1649.

Zhao HL, Yao N, Wei XJ, et al.miR-196a-5p suppresses self-renewal of mouse embryonic stem cells. Basic & Clinical Medicine, 2014, 34(12): 1645-1649.

[17] Huang N, Wang J, Xie W, et al. MiR-378a-3p enhances adipogenesis by targeting mitogen-activated protein kinase 1. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2015, 457(1): 37-42.

[18] 黃筠雅. Map4k3 基因對脂肪細胞分化的影响. 慈濟大學生命科学研究所学位论文, 2012.

Huang JY. The effect of Map4k3 on adipocytes differentiation. Dissertation of institute of life science, tzu chi university, 2012.

[19] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nature Genetics, 2006, 38(2): 228-233.

[20] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. Gynecologic Oncology, 2008, 110(1): 13-21.

[21] Delaloy C, Liu L, Lee JA, et al. MicroRNA-9 Coordinates Proliferation and Migration of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Progenitors. Cell Stem Cell, 2010, 6(4): 323-335.

[22] Gaudet AD, Fonken LK, Gushchina LV, et al. miR-155 Deletion in Female Mice Prevents Diet-Induced Obesity. Scientific Reports, 2016, 6(22862): 1-10.

[23] Du J, Cheng X, Shen L, et al. Methylation of miR-145a-5p promoter mediates adipocytes differentiation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 475(1): 140-148.

[24] Tan Z, Du J, Shen L, et al. miR-199a-3p affects adipocytes differentiation and fatty acid composition through

targeting SCD.Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 492(1): 82-88.

[25] Du J, Xu Y, Zhang P. et al. MicroRNA-125a-5p Affects Adipocytes Proliferation, Differentiation and Fatty Acid Composition of Porcine Intramuscular Fat. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(2): 1-3.

[26] Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, et al. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. Genes & Development. 1993, 7(5): 812-821.

[27] Stacey DW. Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. Current Opinion in Cell Biology. 2003, 15(2): 158-163.

[28] Koff A, Dulic V, Lees E, et al. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G 1 phase of the human cell cycle : Science 257, 1689–1694. Trends in Cell Biology, 1992, 2(12): 362-362.

[29] Meyer CA, Jacobs HW, Lehner CF. Cyclin D-cdk4 is not a master regulator of cell multiplication in Drosophila embryos. Current Biology, 2002, 12(8): 661-666.

[30] Siersbæk R, Nielsen R, Mandrup S. PPARγ in adipocyte differentiation and metabolism – Novel insights from genome−wide studies[J]. Febs Letters, 2010, 584(15): 3242-3249.

[31] Choi SK, Park S, Jang S, et al. Cascade regulation of PPARγ(2) and C/EBPα signaling pathways by celastrol impairs adipocyte differentiation and stimulates lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. Metabolism Clinical & Experimental, 2016, 65(5): 646-654.

[32] J Z, F G, G W, et al. miR-20a regulates adipocyte differentiation by targeting lysine-specific demethylase 6b and transforming growth factor-β signaling. International Journal of Obesity , 2015, 39(8): 1282-1291.

[33] Rosen ED, Hsu CH, Wang X, et al. C/EBPα induces adipogenesis through PPARγ: a unified pathway. Genes & Development, 2002, 16(1): 22-26.

[34] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. Annual Review of Cell & Developmental Biology, 2007, 23(23): 175-205.

[35] Bost F, Aouadi M, Caron L, et al. The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. Biochimie, 2005, 87(1): 51-56.

[36] Machinalquélin F, Dieudonné MN, Leneveu MC, et al. Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. American Journal Physiol Cell Physiol, 2002, 282(4): C853-c863.